

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-078484

(43)Date of publication of application : 19.03.2002

(51)Int.Cl.-

C12N 5/06

A61L 27/00

(21)Application number : 2001-255410

(71)Applicant : MERCK PATENT GMBH

(22)Date of filing : 27.08.2001

(72)Inventor : JESCHKE BRIGITTE
MEYER JOERG
ADAMIETZ PETER
MEENEN NORBERT
GOEPFERT CHRISTIANE

(30)Priority

Priority number : 2000 10042484 Priority date : 29.08.2000 Priority country : DE

(54) METHOD FOR PRODUCING HUMAN CARTILAGE IMPLANT BY USING CARTILAGE CELL CULTURED IN VITRO

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a human cartilage implant having the biochemical composition and biomechanical properties almost same to those of the corresponding protoplast by using cartilage cells cultured in vitro.

SOLUTION: This method comprises the following practice: up to 20 vol.% of human serum is used as the medium additive; cartilage cells are first redifferentiated under a reduced oxygen partial pressure, and then kept at monolayer culture till the 12th passage under 21% oxygen partial pressure in order to induce the formation of a three-dimensional cartilage tissue by agglutination.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-78484

(P2002-78484A)

(43) 公開日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 5/06		A 6 1 L 27/00	G 4 B 0 6 5
A 6 1 L 27/00		C 1 2 N 5/00	E 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2001-255410(P2001-255410)
(22) 出願日 平成13年8月27日 (2001.8.27)
(31) 優先権主張番号 1 0 0 4 2 4 8 4 . 8
(32) 優先日 平成12年8月29日 (2000.8.29)
(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 591032596
メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
ト ベシュレンクテル ハフトング
Merck Patent Gesell
schaft mit beschrae
nkter Haftung
ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダルム
シュタット フランクフルター シュトラ
ーセ 250
(74) 代理人 100088328
弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *in vitro*で培養された軟骨細胞によるヒト軟骨移植片の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 *in vitro*で培養された軟骨細胞からのヒト軟骨インプラントであって、それらの生化学的組成および生体機械的性質に関して、可能な限り原物に近いインプラントを製造する方法を提供する。

【解決手段】 この方法では、培地添加物として20容積%までのヒト血清を用いる。軟骨細胞は、まず、低下した酸素分圧下で再分化させ、次いで、21%の酸素分圧下で、凝集による三次元の軟骨組織の形成を誘起させる目的で、第12継代まで単層培養に保つことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *in vitro*で培養された軟骨細胞からヒト軟骨インプラントを製造する方法であって、従来の方法で、様々な酵素溶液を加えることによって、患者自身の軟骨から軟骨細胞を分離し、分離した軟骨細胞を細胞培養ビン中に播種し、ヒトおよび／または仔ウシ血清および成長因子を加えた栄養溶液中で培養し、精製した軟骨細胞をアルギン酸塩含有緩衝溶液中に回収し、直ちに封入を行い、次いで34～39℃で数週間、酸素分圧を下げて培養し、そして、クエン酸緩衝溶液を加えることによりアルギン酸塩から細胞を分離し、分離した軟骨細胞を遠心分離し、軟骨形成性成長因子、ヒト血清およびさらに添加物を含む栄養溶液と共に数日間培養し、凝集塊をプレートのアガロースでコーティングしたウェル中に再び包埋し、前記アルギン酸塩相と同一の条件、但し、O₂分圧21%下で、凝集した細胞を培養することを特徴とする方法。

【請求項2】 細胞培養ビンに播種された、分離した軟骨細胞を、ヒトおよび／または仔ウシ血清および成長因子ならびにサイトカインを加えた栄養溶液中で培養することを特徴とする、請求項1に記載の軟骨インプラントの製造方法。

【請求項3】 アルギン酸塩から分離した軟骨細胞が、遠心分離の後、平面上でシート様形状を有する軟骨を形成することを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 軟骨形成性成長因子として、IGF-IおよびTGF- β を5～10：1の比で加えることを特徴とする、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 加えるサイトカインが、0.1から3 ng/mlまでの濃度のIL-4であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 酸素分圧を10%未満まで低下させることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】 凝集塊培養物を調製するために、培地添加物として20容積%までのヒト血清を用いることを特徴とする、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 軟骨細胞を第12継代まで単層培養に保つことを特徴とする、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 軟骨細胞を第7継代まで単層培養に保つことを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 高いI型コラーゲン／I型コラーゲン比が得られることを特徴とする、請求項1から9のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、*in vitro*で培養された軟骨細胞からヒト軟骨インプラントを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】関節軟骨は、関節表面損傷の修復に関しては極めて限られた能力しか持っていない。*in vitro*で製造された軟骨に基づく関節表面損傷の外科療法における実行可能な考え方は、中でも、軟骨インプラントは、自家細胞（軟骨細胞または間葉幹細胞）から得ることができ、それは、生化学的組成および生体機械的性質に関して、できる限り原物に近くなるということを前提条件としている。原則として、軟骨細胞と間葉幹細胞は共に、この目的に適している。

【0003】自家細胞は、生検試料の形態で、少数を手でできるのみであるため、有効な*in vitro*における増殖が必要である。文献でも知られているように、継代数が増加するにつれ、分化した表現型の減損が常に観察されおり、これが特有な課題となる。このことは、軟骨の合成は、初代細胞または第一継代細胞を用いる際には、単に細胞／細胞接触を増加させるだけで促進できるが、増殖の目的で細胞を幾度も継代させなければならぬ場合には、この方法では十分でないことを意味している。特定の血清やbFGFなどの特定の成長因子といった、様々な添加剤により、増殖期中における軟骨形成能力の減退を停止させることは、これまでのところ、ヒト細胞では達成されていない。

【0004】細胞培養皿／ビンにおいて、ヒト軟骨細胞を増殖させ（細胞はこの単層培養中に脱分化する）、それ続いて、アルギン酸塩ゲル中における細胞再分化はすでに知られている。この細胞ならびにそれを取り巻く基質は、アルギン酸塩内あるいはアルギン酸塩より細胞を溶解した後、様々な方法を用いて、順次解析されている（Bonaventure J.他、Exp. Cell Res., 212巻(1号)、97～104頁、1994年、Reexpression of Cartilage-Specific Genes by Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes Cultures in Alginate; ; Yaeger P.C.他、Exp. Cell Res., 237巻、318～325頁、1997年、Synergistic Action of Transforming Growth Factor- and Insulin-like Growth Factor-I Induces Expression of Type II Collagen and Aggrecan Genes in Adult Human Articular Chondrocytes）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来技術における前述の障害を回避する、十分なサイズの実質的に分化した軟骨組織（個々の細胞ではなく）の培養方法を提示することであって、その結果、その軟骨組織は「プレスフィット」方式で（すなわち、回転に安定なつめ物として）関節軟骨欠損に移植することを可能とす

る。

【0006】

【課題を解決するための手段】この目的は、請求項1に示す特徴的な要件を有する、*in vitro*で培養された軟骨細胞からのヒト軟骨インプラントを製造する方法によって達成される。

【0007】請求項1に記載の方法は、ヒト軟骨細胞に使用できるばかりではない。動物モデルにおいて示されるように、ブタ軟骨細胞にも同様に適している。他の動物種（例えば、ラクダ、ヒトコブラクダ、ウマ、イヌあるいはネコ）由来の軟骨細胞による使用も考えられる。

【0008】既に上で述べたように、本発明にかかる方法は、再分化させるため、アルギン酸塩ゲル中に軟骨細胞を封入するための従来型の手順を利用している。しかしながら、成功の要点は、改良した培養条件であり、培地の20容積%まで添加する、ヒト血清（胎児仔ウシ血清の代わりに）を使用、軟骨形成性成長因子（ IGF-I および $\text{TGF-}\beta$ ）の添加、さらに10容積%未満への酸素分圧の低減が主要点である。何週間にもわたって適用される、これらの条件のみで、その後、凝集して、実際に軟骨形成することができる軟骨細胞が得られる。あるいは、 IGF-I の代わりに IGF-II も使用することもできる。サイトカイン インターロイキン4（ IL-4 ）の添加は、さらに、軟骨形成を活性化する。

【0009】*in vitro*で膨張した軟骨細胞の場合には、アルギン酸塩ゲル中への封入は、本来の軟骨形成能力を発揮するのに適当な手法として、これまでも記載されている（Yaeger P. C. 他、Exp. Cell Res., 237巻、318~325頁、1997年、Synergistic Action of Transforming Growth Factor- and Insulin-like Growth Factor-I Induces Expression of Type II Collagen and Aggrecan Genes in Adult Human Articular Chondrocytes）。しかしながら、本発明にかかる方法では、この方法（ヒト血清の使用、おとび酸素分圧の低減を伴わない）は、準備用途には適していない。得られるコンドロロン（chondrone）様構造（以後「コンドロロン」と呼ぶ）は、クエン酸塩などのキレート化剤によって、注意深くゲルの溶解を行って得られるが、本発明にとって不可欠である一連の条件の1つでも遵守されていない場合には、それらは高いI型コラーゲン含有量を有し、また、凝集して軟骨組織を形成する性質を示さない。

【0010】最小量のI型コラーゲンを有するヒアリン様軟骨の形成における、「コンドロロン」の利用が格別に有力であることも、動物モデルにおいて明らかにされている。*in vitro*で膨張し、アルギン酸塩ゲル中に含まれたブタ軟骨細胞が得られたならば、コンドロロン様細胞外基質を形成するための8から12日間の誘導が、続く最小量のI型コラーゲンを有するヒアリン様軟

骨の形成を満足する必要条件となる。ヒト軟骨細胞における再分化には、前述の条件下での何週間もの培養が必要であるが、ブタ軟骨細胞の場合では、通常の（21%）酸素分圧、ならびに軟骨形成性成長因子の添加下での8~12日間で、高いI型コラーゲン/I型コラーゲン比を有するヒアリン様軟骨の形成には十分である。

【0011】

【発明の実施の形態】さらには、アルギン酸塩から分離される軟骨細胞は、遠心分離の後、平面上で、シート形状を有する軟骨を形成する、請求項3に記載の方法が好ましい。軟骨細胞は、平坦な底を有する遠心管中で遠心分離する。この場合、移植に求められるようなシート様軟骨凝集物の形成に役立つ。加えて、シート形状のインプラントは、その狭い折り距離のため、*in vitro*培養中の供給/処置に利点をもたらす上でも貢献する。

【0012】さらには、軟骨形成性成長因子として、 IGF-I および $\text{TGF-}\beta$ を5~10:1（w:w）の比で添加する、請求項4に記載の方法が好ましい。軟骨形成をさらに促進するための、0.1~3ng/mlのインターロイキン4の添加が同様に好ましい。

【0013】さらに、酸素分圧を10%未満まで低下させる方法も好ましい。5%に低減した分圧がとりわけ好ましい。コラーゲンI型とII型との比に対する、低減した酸素分圧の効果の、ヒト軟骨細胞の分化における重要性は、付録の図1から理解することができる。

【0014】凝集塊培養物の調製に対する、20容積%までのヒト血清を培地添加物として利用する方法も好ましい。10容積%のヒト血清の培地への添加が特に好ましい。

【0015】適宜、軟骨細胞を第12継代まで、特に好ましくは第7継代まで、単層培養に保つ、請求項8に記載の方法も好ましい。

【0016】さらには、高I型/I型コラーゲン比が得られる、請求項10に記載の方法が好ましい。高いI型/I型コラーゲン比は、望み通りに、選択的にI型コラーゲンが薄い外層中に生じるいることの証である。正確な定量データは免疫学的分析から導くことができるが、サンプルの絶対的サイズに左右される。従前の技術では、I型コラーゲンで優先的に構成されている、表面層に対して、10~20%の値が得られている。（T. MinasおよびS. Nehrer, Orthopedics, 20巻(6号)、525~538頁、1997年、Current concepts in treatment of articular cartilage defects）。

【0017】上ならびに下に用いる略語は、以下の意味を有する。

PBS	リン酸緩衝食塩溶液
DMEM	Dulbeccoの改良イーグル培地、高濃度グルコース含有
DMEM/Ham's F12	F12との（1:1）混合培地

bFGF 塩基性線維芽細胞生長因子
 EGF 上皮生長因子
 HEPES N-2-ヒドロキシエチルピペラジ
 ン-N'-2-エタンスルホン酸
 IGFまたはIGF-I インスリン様成長因子1
 TGF- β 形質転換成長因子 β
 IL-4 インターロイキン4
 w:w 重量対重量

【0018】

【実施例】2つの実施例を参照しながら、以下に本発明 10
 をより詳細に記載し説明する。

【0019】実施例1

軟骨細胞の分離

60歳女性患者の橈骨頭部由来の関節軟骨は、剥ぎ取
 り、血液および組織残部を除去し、外科用メスを用いて
 ベトリ皿で細断した。軟骨片を磁気攪拌機が具えた消化
 チャンバーのふるい上に置き、ヒアルロニダーゼ溶液
 （ヒアルロニダーゼ25mgのPBS50ml溶液）5
 0mlと共に37℃で25分間攪拌した。次いで、かか
 る組織を、0.25質量%トリプシン/EDTA（45 20
 分、37℃、攪拌）50mlでインキュベートし、DM
 EM50ml+FCS10容積%で5分間洗浄した。組
 織構造からの軟骨細胞の溶解は、3回のコラゲナーゼ処
 理（コラゲナーゼ1a）で行い、組織を37℃で攪拌し
 ながらコラゲナーゼ溶液50ml（DMEM+FCS1
 0容積%+ペニシリン100U/ml+ストレプトマイ
 シン100 μ g/mlの50mlに25mg含有）と共
 にインキュベートし、そして、細胞を濾別された溶液が
 ら遠心分離（500 \times g、5分）した。組織を、コラゲ
 ナーゼで、まず2時間、その後の2回は、一夜消化し 30
 した。続いて、DMEM+FCS10容積%の添加を通し
 て、細胞を組織から洗い落とし、前述のように遠心分離
 した。

【0020】単層培養

分離した軟骨細胞を、細胞培養ビン中に10⁴細胞/c
 m²の密度で播種し、DMEM/Ham's F12（1
 /1）+FCS10容積%+bFGF10ng/ml+
 EGF1ng/mlの培地で培養した。培地は1週間に
 2度交換し、1週間に一度、0.25質量%トリプシ
 ン/EDTAを用いて細胞を継代した。軟骨細胞は、第7 40
 継代まで単層培養に保たれた。

【0021】アルギン酸塩培養

NH緩衝液（0.15M NaCl+25mM HEP
 ES、pH7.4）中の洗浄工程の後、細胞を、NH緩
 衝液+アルギン酸カリウム1.2質量%中に採取した
 （密度は1mlあたり細胞100万個）。いずれの場合
 も、細胞懸濁液1mlを、12-穴プレート（0.1M CaCl₂/25mM HEPES3ml
 で満たす）中に滴下して導入した。アルギン酸塩中への
 細胞の封入を直ちに行った。そのアルギン酸塩ビーズ 50

は、15分後にNH緩衝液中で2回洗浄した。

【0022】次いで、アルギン酸塩に封入された細胞
 は、DMEM+ヒト血清10容積%+アスコルビン酸5
 0 μ g/ml+IGF100ng/ml+TGF- β 1
 0ng/mlの培地中に移し採り、37℃、5%
 O₂、相対大気湿度95%で3週間、培地を1週間に3
 回交換しつつ、インキュベーター中で培養した。様々な
 ヒト血清ならびにFCSについても試験した。5%と2
 1%のO₂分圧を互いに比較した（図1を参照）。

【0023】アルギン酸塩から細胞を分離するために、
 15分間反転させつつ、NH緩衝液+55mMクエン酸
 ナトリウムを添加して、アルギン酸塩を溶解するに先立
 ち、NH緩衝液でまず2回洗浄した。

【0024】凝集塊培養

分離した細胞を、NH緩衝液で再洗浄し、15mlのG
 reiner管の、合成樹脂で成型した底上に遠心分離
 した（50 \times g、10分）。DMEM+ヒト血清10容
 積%+アスコルビン酸50 μ g/ml+IGF100n
 g/ml+TGF- β 10ng/mlの培地で2日間培
 養した後、凝集塊を、アガロースでコーティングした1
 2-穴プレートのウェル中に再び包埋した。凝集した細
 胞を、DMEM+ヒト血清10容積%+IGF100n
 g/ml+TGF- β 10ng/ml+ペニシリン/ス
 レプトマイシンの培地中で、2~3週間、アルギン酸
 塩培養と同一条件、但し、21%のO₂分圧下にて培養
 した。

【0025】この方法は、様々なヒト血清では成功した
 が、FCSではうまくいかなかった。

【0026】実施例2

軟骨細胞の分離および単層培養は、実施例1の記載と同
 様に行った。

【0027】アルギン酸塩培養および凝集塊培養物の調
 製も、実施例1の記載と同様に行った。しかしながら、
 軟骨形成性の更なる誘導のため、アルギン酸塩培養およ
 び凝集塊培養中に2ng/mlのサイトカインIL-4
 を添加した。

【0028】図1の説明

HS1-HS4=様々なヒト血清

CI1=コラーゲンII（対照）

CI=コラーゲンI（対照）

バンドは、5%のO₂よりも21%のO₂における方がよ
 り濃い。しかしながら、21%のO₂では、より多くの
 I型コラーゲンが生成しており、その結果、II型/I
 型コラーゲン比は好ましくない。

【0029】5%のO₂では、ヒト血清の使用では、僅
 かなI型コラーゲンが生成するのみである。対照的に、
 FCSを使用すると、II型/I型コラーゲン比は著し
 く損なわれている。

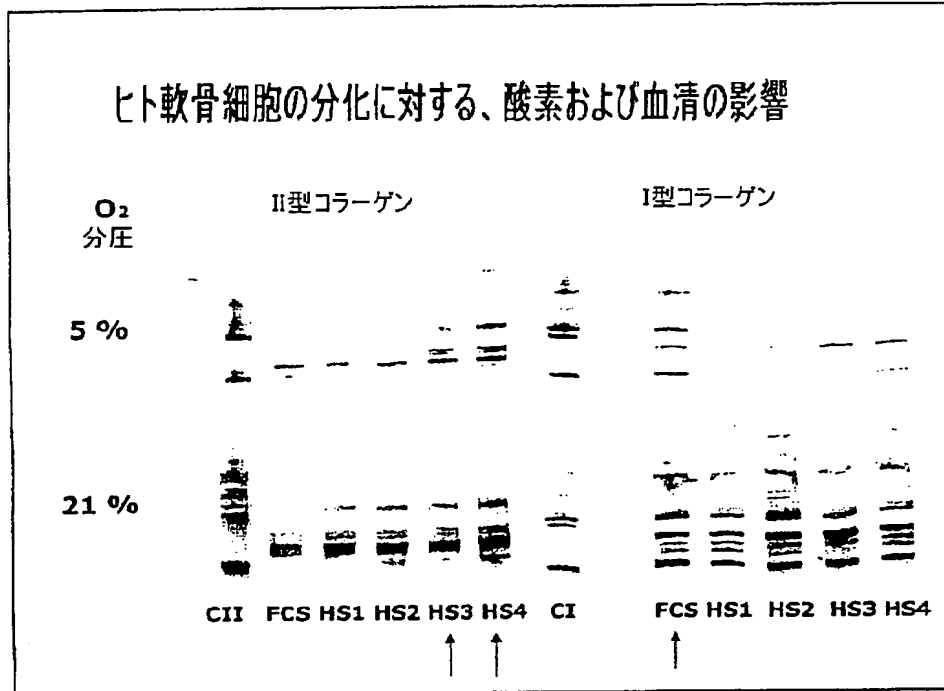
【図面の簡単な説明】

【図1】異なる酸素分圧で培養した軟骨細胞中のII型

およびI型コラーゲンのイムノブロットである。

BEST AVAILABLE COPY

【図1】



フロントページの続き

(71)出願人 591032596

Frankfurter Str. 250,
D-64293 Darmstadt, Fed-
eral Republic of Ge-
rmany

(72)発明者 ブリジット ヨシュケ

ドイツ連邦共和国 65779 ケルクハイム
ロゼルトシュトラッセ 33

(72)発明者 ヨルク メール

ドイツ連邦共和国 63150 ホイセンスタ
ン イン ソメルフェルト 65

(72)発明者 ペーター アダミーツ

ドイツ連邦共和国 22145 ハンブルク
スタークヴェーク 2エー

(72)発明者 ノルベルト メーネン

ドイツ連邦共和国 22587 ハンブルク
ピカルテンカンブ 40アー

(72)発明者 クリスチャン ゲブフェルト

ドイツ連邦共和国 22527 ハンブルク
キーレル シュトラッセ 699

Fターム(参考) 4B065 AA93X BB09 BB18 BB19

BB25 BC10 BC31 BD15 CA44

4C081 AB02 BA12 BA13 CD34 DA01

DA02 EA11